


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Т.Г. Волова


«19» июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Влияние депонированных форм гербицида метрибузина на почвенную
микрофлору при выращивании пшеницы с модельными сорными растениями

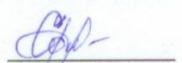
Руководитель


подпись, дата

проф., д-р биол. наук
должность, ученая степень

С. В. Прудникова
инициалы, фамилия

Студент


подпись, дата

Е. А. Соложенникова
инициалы, фамилия

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияние депонированных форм гербицида метрибузина на почвенную микрофлору при выращивании пшеницы с модельными сорными растениями» содержит 34 страницы текстового документа, 12 иллюстраций, 1 таблицу, 1 приложение, 43 использованных источника.

Ключевые слова: поли-3-гидроксibuтират (ПЗГБ), депонированные формы, гербициды, метрибузин, микрофлора почвы.

Целью работы было изучение влияния гербицида метрибузина, депонированного в полимерную основу из поли-3-гидроксibuтирата, на ризосферную микрофлору пшеницы (*Triticum aestivum*) при выращивании с модельными сорными растениями (донник обыкновенный, *Melilotus albus*). В задачи исследования входило: 1) Определить общую численность грибов и бактерий в ризосферной почве пшеницы при использовании депонированных форм метрибузина в виде пленок и микрогранул в сравнении с коммерческим препаратом метрибузина Зенкор Ультра. 2) Исследовать влияние различных способов внесения метрибузина в почву на таксономический состав ризосферной микрофлоры. 3) Оценить гербицидное действие различных форм метрибузина на донник в посевах пшеницы.

В данной работе затронута одна из актуальных на сегодняшний день областей исследования – депонирование сельскохозяйственных препаратов в полимерную основу из биоразрушаемых полимеров, характеризующихся адресной доставкой и пролонгированным действием, для снижения негативного воздействия химических веществ на окружающую среду. Исследование показало, что метрибузин, депонированный в полимерную основу из ПЗГБ в форме микрогранул, не оказывал достоверного влияния на развитие ризосферных бактерий.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Обзор литературы	6
1.1 Новое поколение пестицидов: препараты с метрибузином	6
1.2 Контролируемое высвобождение – новый метод применения пестицидов	9
1.3 ПГА – основа для депонирования	10
2 Методы исследования.....	17
2.1 Общий план эксперимента	17
2.2 Определение численности микроорганизмов в ризосфере тестовых растений.....	18
2.3 Идентификация бактерий	19
3 Результаты исследования	21
3.1 Влияние различных форм метрибузина на численность почвенных бактерий.....	21
3.2 Влияние различных способов внесения метрибузина в почву на таксономический состав ризосферной микрофлоры	22
3.3 Гербицидное действие различных форм метрибузина в посевах пшеницы, зараженных сорными растениями	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	26

Введение

Интенсивные технологии ведения сельского хозяйства сопровождаются применением огромного количества разнообразных химических веществ для борьбы с вредителями, сорняками и возбудителями болезней культивируемых видов. Однако, неизбирательное применение пестицидов и удобрений вызывает загрязнение окружающей среды, появление устойчивых к препаратам сельскохозяйственных вредителей и патогенов, а также утрату биоразнообразия [6].

Сфера биотехнологий открывает целый ряд потенциально возможных областей применения в сельском хозяйстве. Применение биотехнологий в медицине и фармакологии уже изучено и активно используется, но интерес к тому, чтобы использовать биотехнологии для защиты растений только начинает расти. В настоящее время все большее внимание направлено на уменьшение количества пестицидов, гербицидов и других биологически активных веществ, используемых в сельском хозяйстве. Один из методов, позволяющих снизить необходимое количество гербицидов, - депонирование активного вещества в матрицу из биоразлагаемого полимера. Это позволит не только увеличить срок действия препарата за счет контролируемого выхода активного вещества, но и минимизировать воздействие на окружающую среду [31, 32].

Среди биоразлагаемых полимеров в настоящее время активно изучаются полимеры, синтезируемые микроорганизмами, как перспективный материал для различных областей применения, в том числе и для создания экологически безопасных форм пестицидов [2, 35]. В качестве таких полимеров могут быть использованы полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластичные, механически прочные и медленно разрушающиеся в биологических средах полимеры. Варьируя формой изделия из ПГА и нагруженностью ее препаратами, можно регулировать скорость разрушения полимерной основы, тем самым управляя скоростью выхода активного вещества. Данные свойства делают ПГА

перспективным материалом для конструирования пролонгированных форм сельскохозяйственных препаратов нового поколения [3].

Целью данной работы являлось изучение влияния гербицида метрибузина, депонированного в полимерную основу из поли-3-гидроксibuтирата, на ризосферную микрофлору пшеницы (*Triticum aestivum*) при выращивании с модельными сорными растениями (донник обыкновенный, *Melilotus albus*). Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить общую численность грибов и бактерий в ризосферной почве пшеницы при использовании депонированных форм метрибузина в виде пленок и микрогранул в сравнении с коммерческим препаратом метрибузина Зенкор Ультра.
2. Исследовать влияние различных способов внесения метрибузина в почву на таксономический состав ризосферной микрофлоры.
3. Оценить гербицидное действие различных форм метрибузина на донник в посевах пшеницы.

1 Обзор литературы

1.1 Новое поколение пестицидов: препараты с метрибузином

Современное сельскохозяйственное производство, направленное на обеспечение человечества безопасной и высококачественной продукцией, невозможно представить без применения инновационных препаратов (химических и биологических средств защиты растений) для получения высоких урожаев, их сохранения и рационального использования [4].

Наиболее широкое применение в борьбе с вредителями сельскохозяйственных культур нашли пестициды. Первоначальное использование пестицидов в сельскохозяйственном производстве было эффективным и показывало высокие результаты. Пестициды помогли улучшить урожайность, а также качество получаемой продукции, даже с точки зрения внешней привлекательности, что часто является важным для потребителей. Пестициды также смогли улучшить питательную ценность пищи, а иногда и ее безопасность. Таким образом, пестициды можно рассматривать как экономичный, трудосберегающий и эффективный инструмент борьбы с вредителями. Но интенсивное применение пестицидов повлекло за собой ряд неблагоприятных последствий, одно из которых – это быстрое развитие устойчивости у ряда вредителей. Особенно ярко это можно увидеть в экосистеме почв. Появление резистентных к пестицидам видов было обусловлено нарушением нормального состава почвенной микробиоты из-за внесения больших доз пестицидов: уменьшение автохтонной микрофлоры почв и увеличение числа видов, несвойственных данной экосистеме. С каждым годом происходило увеличение не только количества, вносимых в почву пестицидов, но и их концентрации, а также частоты внесения препаратов. Следствием таких мер стало накопление пестицидов в почве в количестве, которое значительно превышает предельно допустимые концентрации [41].

Таким образом, широкое и нерациональное применение таких химических веществ как пестициды привело к увеличению негативного воздействия на окружающую среду. Отрицательно влияние включает в себя ущерб, наносимый сельскохозяйственным угодьям, животным и растительным организмам, здоровью человека, а также загрязнение объектов окружающей среды – почв, поверхностных и подземных вод, атмосферного воздуха.

Многие из неблагоприятных воздействий пестицидов на окружающую среду зависят от взаимодействия между физико-химическими свойствами самого пестицида (стабильность, растворимость и т. д.) и почвенными факторами (рН, органические и неорганические компоненты, почвенная влага, почвенная микрофлора и фауна), а также видами растений и климатическими условиями [21].

В настоящее время разработка новых видов пестицидов и увеличение объемов производства такой стремительно развивающейся сферы науки и производства, как химизация, являются одними из важнейших путей повышения урожайности и продуктивности. Вследствие этого, масштабы производства и применения пестицидов растут [9]. И наиболее интенсивный рост наблюдается в потреблении пестицидов, принадлежащих к новым классам соединений, которые имеют преимущества перед ранее использовавшимися препаратами и решают проблемы с вредителями и более эффективной борьбы с сорняками. В связи с актуальностью применения пестицидов в сельском хозяйстве исследования направлены на создание пестицидов с менее токсичным и более избирательным действием, а также на снижение цены их производства. [42].

На глобальном уровне ежегодные потери, связанные с наличием сорных растений, составляют около 10-15% от производства основных сельскохозяйственных культур. В настоящее время насчитывается 227 сорных видов, ответственных за 90% повреждений урожая, 18 из которых считаются самыми опасными в мире. Поэтому 47,5% из 2 миллионов тонн пестицидов, потребляемых в глобальном масштабе каждый год, приходится на гербициды

[16, 37]. Именно поэтому для борьбы с сорняками необходимо выбирать наиболее безопасные с экологической точки зрения препараты. Одним из таких препаратов является метрибузин – универсальный гербицид широкого спектра действия [1].

Метрибузин [4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио-1,2,4-триазин-5(4H)-он] – пестицид, относится к 1,2,4-триазинонам (рис. 1). Эти гербициды отличаются широким спектром действия на ряд двудольных и злаковых сорняков [14]. Данный препарат эффективен против таких сорных растений как амброзия, щетинник, пастушья сумка, росичка кровяная, лисохвост полевой, портулак огородный, овсюг, лазорник, куриное просо, плевла, полевица, щирица, василек синий, марь белая, мокрица, ромашка луговая и непахучая, горец, горчица полевая, осот, вероника, дурнишник [7]. Препараты данной группы обладают продолжительным эффектом, поскольку действуют как через листья, так и через почву. По механизму действия метрибузин относится к ингибиторам фотосинтеза [14]. Метрибузин хорошо растворяется в воде, слабо сорбируется в почве и приводит к загрязнению грунтовых вод в результате вымывания из нижних горизонтов почвы [24].

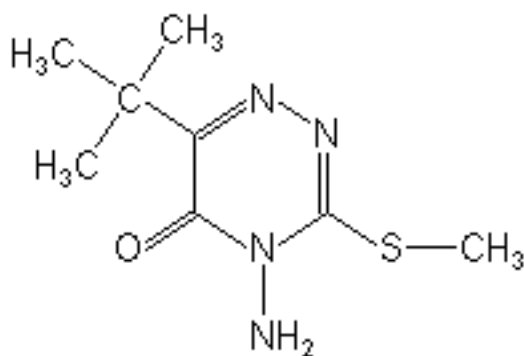


Рисунок 1 – Структурная формула метрибузина

Норма расхода препарата на основе метрибузина зависит от свойств почвы и времени обработки. На легких почвах с малым содержанием гумуса нормы расхода значительно ниже, чем на тяжелых глинистых почвах.

Максимальные дозы внесения метрибузина используют при опрыскивании почвы до высадки рассады (томаты) или до всходов культуры (картофель). При проведении обработок по всходам культуры дозы внесения снижают. Препараты на основе метрибузина применяются в сельском и личных подсобных хозяйствах против однолетних двудольных и злаковых сорняков. Метрибузин сравнительно малотоксичен и не обладает раздражающим действием [14].

1.2 Контролируемое высвобождение – новый метод применения пестицидов

За последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в области применения химических препаратов. Результатом работы ученых стало повышение эффективности химических средств, снижение частоты применения и побочных эффектов, связанных с дозированием. Такие достижения связаны с развитием и внедрением не только в медицинскую отрасль, но и в сельскохозяйственный сектор препаратов с контролируемым выходом активного компонента [22].

Под контролируемым высвобождением понимают регулируемый перенос активного вещества из резервуара к целевой поверхности для поддержания заданного уровня концентрации вещества в течение определенного периода времени [36].

Важным звеном в формировании системы контролируемой доставки препаратов является матрикс. Ученые на протяжении многих лет занимаются разработками устройств доставки пестицидов с использованием различных материалов. Эти материалы включают полимеры, кремнезем, полифосфаты, воски, глину и некоторые другие. Однако материалы, используемые для подготовки систем контролируемой доставки, должны соответствовать некоторым требованиям, связанным с диффузией, растворимостью, деградацией и изготовлением материалов. Полимеры в целом обладают всеми

характеристиками, необходимыми для разработки препаратов с контролируемым высвобождением [18]. Скорость выхода препарата из полимерной основы зависит от структуры и природы носителя. Поэтому выход активного вещества можно регулировать, выбирая подходящую форму носителя. Это открывает новые возможности применения систем контролируемой доставки в различных отраслях промышленности и медицине [29].

Обычные методы использования гербицидов, такие как опрыскивание или полив, дают высокую начальную концентрацию активного вещества, которая вскоре стремительно падает ниже эффективного уровня [8]. Метод контролируемого высвобождения позволяет поддерживать эффективный уровень активного вещества в течение длительного и контролируемого времени. Данный метод широко применяется для доставки пестицидов, гербицидов и удобрений [39].

Преимуществами контролируемого высвобождения веществ являются постоянный уровень активного вещества в течение длительного периода и в меньших дозах, снижение потери от испарения, снижения фитотоксичности, снижение загрязнения окружающей среды и легкость в обработке. Поддержание необходимой для борьбы с вредителями концентрации активного вещества сводит к минимуму не только вред урожаю, но и окружающей среде [33]. Инкапсуляция гербицидов в полимерную матрицу может помочь в достижении этих целей. Это позволит снизить потери в результате испарения и деградации, выщелачивание и токсичность [37].

1.3 ПГА – основа для депонирования

Развитие науки и техники приводит к все более широкому внедрению в практику целевых продуктов, синтезируемых микроорганизмами. Ценным продуктом биотехнологии являются микробные полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот (рис. 2), синтезируемые

бактериями в качестве внутриклеточного запасного вещества. Эти соединения обладают ценными свойствами: по ряду физико-химических свойств они близки к синтетическим полимерам, но в то же время способны быстро разлагаться, не выделяя токсических веществ в окружающую среду. Начинает формироваться рынок изделий из ПГА бытового, пищевого и сельскохозяйственного назначения: разрушаемая упаковка пищи и напитков, предметы гигиены и санитарии, горшечная продукция и т.д. В этой связи новым и экологически значимым направлением применения ПГА может стать его использование для депонирования и доставки сельскохозяйственных препаратов [11, 12].

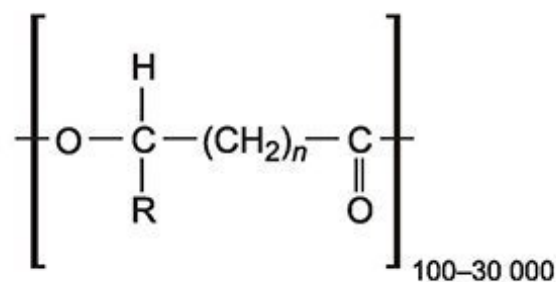


Рисунок 2 – Общая формула полигидроксиалканоатов

При выборе материалов для применения в полевых условиях, решающее значение имеют такие свойства, как токсичность, биосовместимость и биоразлагаемость. Микробные полигидроксиалканоаты обладают спектром полезных свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость. Природные полимеры, синтезируемые микро – и макроорганизмами, подвержены деструкции и разлагаются в окружающей среде, вовлекаясь в круговорот. В этих процессах ключевую роль играют микроорганизмы, которые способны ассимилировать разнообразные органические соединения, обеспечивая самоочищение окружающей среды от загрязняющих веществ. Именно поэтому, полигидроксиалканоаты перспективны в качестве изделий для сельского хозяйства [27].

С ростом перспектив применения ПГА все большую актуальность приобретает исследование закономерностей разрушаемости ПГА в естественных природных условиях. Деграция полимеров в естественных экосистемах, таких как почва, компост или водоем, происходит в результате процессов гидролиза, механических, термических, окислительных и фотохимических реакций, а также под действием микроорганизмов [17].

Экспериментально было доказано, что к показателям деструкции ПГА, как правило, относят уменьшение кристалличности и молекулярной массой полимера, а также изменения прочности и общего веса полимерных изделий [23]. Как известно, ПГА в своей структуре содержат аморфные и кристаллические области, из которых аморфные области являются наиболее восприимчивыми к воздействию микроорганизмов. Таким образом, микробная деграция ПГА связана с уменьшением его молекулярной массы и увеличением степени кристалличности [17].

Способность ПГА разрушаться под воздействием специфических микробных ферментов является одним из самых ценных свойств этих полимеров. Учеными обнаружено более 300 штаммов микроорганизмов, способных разлагать ПГБ до CO_2 и H_2O . К ПГА-деградирующим микроорганизмам относят бактерии и грибы, обладающие специфическими ферментами – ПГА-деполимеразами. Отмечено, что микроскопические грибы являются наиболее активными деструкторами ПГА, так как их ПГА-деполимеразы обладают большей активностью [13]. На сегодняшний день известно около 95 грибковых штаммов из различных наземных условиях и принадлежащих к разным систематическим и экологическим группам, способных к деграции ПГА [17]. Микромицеты-деструкторы относятся к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Pythium*, *Purpureocillium*, *Acremonium* [5,13]. Показано, что наиболее активное участие в деструкции гомополимера П(ЗГБ) по сравнению с сополимерами принимают грибы рода *Aspergillus sp.* Однако, особенностью грибковой деграции является то, что только при определенных условиях окружающей среды (влажность,

температура, pH) активность ПГА-деполимераз микромицетов будет наиболее высокой, а значит и скорость деградации изделий из ПГА будет выше [34].

Исследования микробиоценозов почв позволили выявить видовой состав бактерий-деструкторов ПГА. Доминирующие бактерии были представлены родами *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Variovorax*. Впервые, используя метод прозрачных зон, было показано, что сообщество микроорганизмов-деструкторов различно для каждого типа ПГА [3].

Важнейшим и наиболее широко изученным представителем полигидроксикарбоновых кислот является полигидроксипантрат (ПГП) – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты. Многие физические и механические свойства полимера зависят от количества и соотношения, входящих в его состав мономеров. ПГП, исходя из количества атомов углерода в мономерных звеньях, относят к короткоцепочечным ПГА. ПГП, как представитель короткоцепочечных ПГА, является термопластиком с высокой степенью кристалличности, образует жесткие и хрупкие кристаллические материалы, которые не могут быть растянуты без разрыва. К другим не менее важным из выявленных свойств П(3ГП) следует отнести биоразрушаемость и биосовместимость. Совокупность этих характеристик делает П(3ГП) одним из наиболее перспективных материалов для применения в различных сферах производства [40, 43].

ПГП сейчас широко известен в качестве полимерного биоматериала, синтезируемого многочисленными микроорганизмами. К настоящему времени насчитывается свыше 300 прокариотических микроорганизмов, способных синтезировать П(3ГП) в различном количестве. К высокопродуктивным штаммам, осуществляющим эффективный синтез П(3ГП) относят бактерии следующих видов: *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Methylobacterium organophilum*. Этот полимер представляет собой продукт ассимиляции углерода и используется микроорганизмами как запасной источник энергии при условии, что другие источники энергии недоступны. Наиболее оптимальным условием для

накопления ПГБ, как правило, является избыток источника углерода и недостаток одного из веществ, таких как азот, сера, фосфор, железо, магний или кислород [20].

Полигидроксibuтират - самый известный представитель семейства ПГА. Этот полиэфир привлек внимание ученых, как экологически чистый полимер, который может быть использован в широком диапазоне сельскохозяйственных, промышленных и медицинских отраслей [17].

Одним из новых и актуальных направлений применения П(ЗГБ) – это использование его в качестве основы для депонирования и адресной доставки гербицидов, применяемых для защиты культурных растений от сорняков [3].

В настоящее время в литературе стали появляться работы, в которых описаны процессы получения и применении инкапсулированных и депонированных в полимерные материалы гербицидов. Однако, данные работы немногочисленны [3]. Так, например, в работе [Sopena et al., 2005] в качестве основы для депонирования гербицида норфлуазона была использована этилцеллюлоза. Гербицид был депонирован в микросферы из этилцеллюлозы методом испарения растворителя, что позволило получить контролируемый выход препарата из полимерной основы. Авторами было установлено, что скорость выхода гербицида зависит от состава полимерной основы, условий ее изготовления, а также свойств полученных изделий. Исследование показало наличие возможности регулировать выход активного вещества, тем самым контролируя рост сорных растений.

Микроинкапсулирование препарата алахтора было исследовано в работе [Femandcz-Urrusuno et al., 2000]. Микросферы с алахтором были изготовлены с использованием в качестве основы для депонирования этилцеллюлозы. Авторами показано, что фактором, влияющими на скорость оттока активного вещества из полимерной матрицы, является соотношение пестицид/полимер.

Исследование нанокапсул из поликапролактона, используемый в качестве материала для депонирования гербицидов триазинового ряда (аметрина, атразина и симазина) было показано в работе [Grillo et al., 2012]. Авторами

было отмечено, что скорость выхода гербицидов из нанокапсул была ниже по сравнению с гербицидами в свободной форме.

В данный момент наблюдается активное исследование метрибузина в качестве модельного препарата для получения пролонгированных форм, в качестве основы для депонирования используют различные материалы как природного, так и синтетического происхождения. Так, в работе [Fernandez-Perez et al., 2010] гербицид метрибузин был депонирован в гранулы из лигнина различного размера. Исследования кинетики выхода активного вещества показали, что скорость высвобождения депонированного в лигнин метрибузина была ниже по сравнению с коммерческим препаратом.

Исследование кинетики выхода метрибузина наблюдали авторы серии работ. Так, в работе [Maqueda et. al., 2008] были изучены формы метрибузина, в которых в качестве матрицы был использован сепиолит. Гранулы на основе сепиолита были нагружены метрибузином на 16,7 и 28,6 % от массы препаративной формы. Выход метрибузина в воду в течение первых часов составил от 50 до 80%. В работе [Céspedes et al., 2013] в качестве основы для депонирования метрибузина были использованы композиты бентонита и антрацина на альгинатной основе. Исследование показало, что полученные формы метрибузина обладают высоким выходом действующего вещества. Показатели кинетики выхода свидетельствуют о контролируемом выходе метрибузина из полимерной основы.

Таким образом, анализ публикаций свидетельствует о том, что использование различных материалов в качестве основы для депонирования гербицидов позволяет варьировать кинетикой выхода в широких пределах, то есть получать системы контролируемой доставки химических средств для эффективной борьбы с сорняками [3].

В настоящее время широкое использование агрохимикатов для стимулирования сельскохозяйственного производства загрязняют не только верхний слой почвы, но и грунтовых вод. Существует необходимость повышения продуктивности сельского хозяйства, однако при этом необходимо

учитывать и урон, который наносят экосистеме. Биотехнологии становятся все более значимыми для аграрного сектора. Многообещающие результаты ожидаются в области поставки пестицидов и биопестицидов растениям. Использование новых материалов для доставки пестицидов позволит уменьшить дозу пестицида и контролировать его выход. Таким образом, инструменты биотехнологий могут быть использованы для решения актуальных проблем окружающей среды: охрана и загрязнение окружающей среды [27].

2 Методы исследования

2.1 Общий план эксперимента

Исследование влияния разных способов доставки метрибузина, в том числе депонированных форм, на ризосферную микрофлору пшеницы проводили следующим образом: посевной материал пшеницы (*Triticum aestivum*) засевали в контейнеры объемом 500 см³, содержащие 500 г полевой почвы, из расчета 100 г семян на 1 м²; одновременно засевали семена модельного сорного растения (донник обыкновенный, *Melilotus albus*). Растения выращивали в климатической камере Conviron A1000 (Канада) при стабилизации режимов среды: освещенность 100-300 мкМоль/м²/сек при температуре 18-28 °С, влажности 65% в течение 50 суток (рис. 3).



Рисунок 3 – Климатическая камера Conviron A1000 (Канада)

Эксперимент включал следующие варианты:

1 – отрицательный контроль (почва без внесения метрибузина);

2-3 – в почву вносили разработанные формы П(ЗГБ)/МЕТ в виде пленок и микрогранул (рис. 4) Все формы были упакованы в чехлы из мелкоячеистого мельничного газа (по 3 образца в каждом контейнере).

4 – положительный контроль (в почву вносили метрибузин в форме коммерческого препарата Зенкор Ультра).

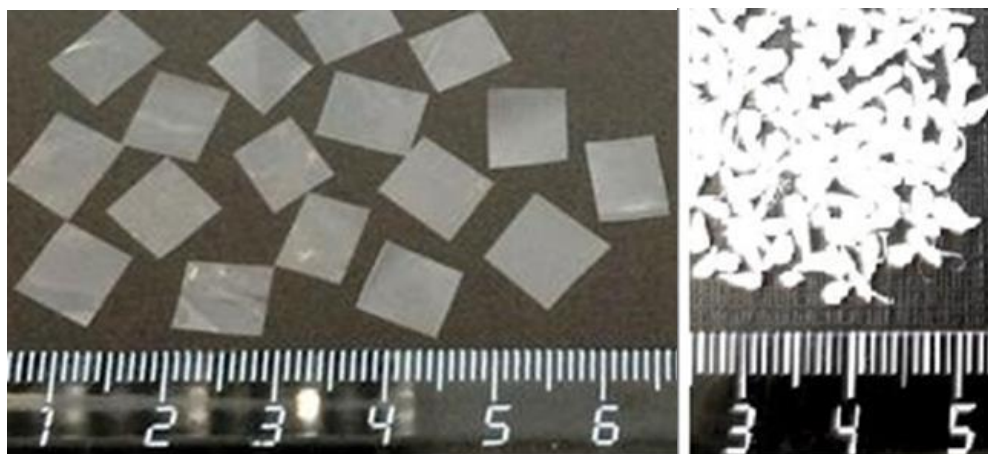


Рисунок 4 – Экспериментальные формы сельскохозяйственных препаратов: пленки и микрогранулы

Концентрация МЕТ в препарате составляла 25% от массы препаративной формы, содержание метрибузина в формах соответствовало количеству метрибузина, вносимого с препаратом Зенкор Ультра - 7,5 мкг/г почвы.

Депонированные формы П(ЗГБ)/МЕТ были изготовлены в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН в виде различных препаративных форм: пленок и микрогранул.

2.2 Определение численности микроорганизмов в ризосфере тестовых растений

Структуру почвенного микробоценоза анализировали общепринятыми методами почвенной микробиологии [10]. Общую численность органотрофных

бактерий определяли на мясо-пептонном агаре (Nutrient agar, HiMedia), актиномицетов – на крахмало-аммиачном агаре. Состав крахмало-аммиачного агара (КАА), из расчета на 1 л воды: крахмал растворимый – 10г, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ – 2г, K_2HPO_4 – 1г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1г, NaCl – 1г, CaCO_3 – 3г, агар – 15г, вода. Посев производили из почвенной суспензии (разведения 10^3 – 10^7) в трехкратной повторности. Чашки инкубировали при температуре 30 °С, в течение 3-7 суток.

Определение общей численности микромицетов в образцах почвы проводили методом высева почвенной суспензии в чашки Петри на агар Сабуро с хлорамфениколом (100 мкг/1 л среды) (Sabouraud agar, HiMedia) для подавления роста бактерий. Посев образцов почвы производили в трёхкратной повторности из разведений до 10^4 . Чашки инкубировали в термостате при температуре 25 °С в течение 7-10 суток, микроскопический анализ колоний проводили с использованием микроскопа AxioStar (Carl Zeiss).

2.3 Идентификация бактерий

Получение чистых культур микроорганизмов проводили методом пересева изолированной колонии бактерий, полученной на чашке Петри, на скошенную агаризованную среду в пробирку. Пробирки инкубировали в термостате при температуре 30 °С в течение 7-10 суток. Микроскопический анализ колоний проводили с использованием микроскопа AxioStar (Carl Zeiss).

Идентификацию бактерий проводили по культурально-морфологическим признакам, а также физиолого-биохимическим особенностям согласно определителю бактерий Берджи [15]. Определение ферментативной активности бактерий было основано на оценке таких параметров как: грампринадлежность, наличие группы ферментов (каталаза, амилаза, лецитиназа, липаза и протеаза) и сахаролитической активности (рис. 5).

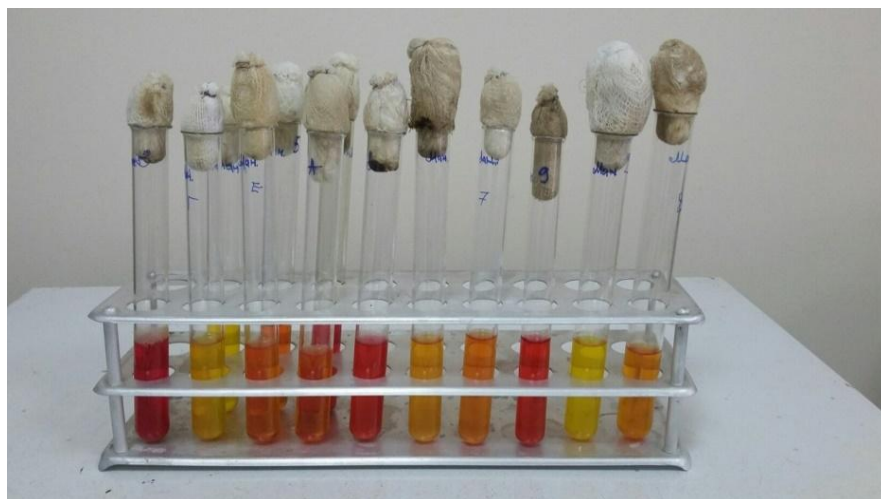


Рисунок 5 – Определение сахаролитической активности бактерий (среды Гисса)

3 Результаты исследования

3.1 Влияние различных форм метрибузина на численность почвенных бактерий

Микробиологический анализ показал, что численность органотрофных бактерий в ризосфере пшеницы была в 1,5 раза ниже, чем в ризосфере сорного растения (донник обыкновенный, *Melilotus albus*). Совместное выращивание пшеницы и донника привело к снижению численности органотрофных бактерий в 1,5 раза по сравнению с численностью бактерий в посевах пшеницы. Полученные данные можно объяснить тем, что в процессе своей жизнедеятельности растения оказывают селективное влияние на ризосферные бактерии. Низкая численность микроорганизмов в ризосфере пшеницы и донника при совместном выращивании может быть связана с конкурентными взаимоотношениями бактерий в ризосфере или недостатком минеральных веществ или влаги, потребляемых двумя видами растений.

Микробиологический анализ показал, что внесение метрибузина в свободной форме привело к резкому падению общей численности бактерий в почве в 1,75 раз по сравнению с негативным контролем. Аналогичный эффект наблюдали при использовании П(ЗГБ)/МЕТ в виде пленок. Вероятно, разрушение пленок происходило быстро, и концентрация метрибузина в этом варианте была выше, чем в варианте с микрогранулами. При внесении МЕТ, депонированного в микрогранулах, общая численность бактерий не отличалась от контрольной.

[Изъята 1 страница]

Анализ численности микромицетов показал противоположный эффект. Численность актиномицетов в ризосфере пшеницы достоверно не отличалась от контрольной во всех вариантах при внесении метрибузина.

[Изъята 1 страница]

Таким образом, из представленных экспериментальных форм метрибузина, наименьшее ингибирующее влияние на ризосферные бактерии оказал П(ЗГБ)/МЕТ, депонированный в форме микрогранул.

3.2 Влияние различных способов внесения метрибузина в почву на таксономический состав ризосферной микрофлоры

Из почвенных образцов в чистую культуру было выделено 13 изолятов, сгруппированных в 5 морфотипов на основании культурально-морфологических признаков.

Штамм №1: колония неправильной формы, коричневого цвета, пигмент есть, плоский профиль, поверхность радиально исчерченная, край ровный. Палочки, мицелий, каталазоположительные, грамположительные.

Штамм №2: колония округлой формы, желтого цвета, пигмент отсутствует, профиль выпуклый, морщинистая поверхность, неровный край. Палочки среднего размера, каталазоотрицательные, грамположительные.

Штамм №4: колония неправильной формы, молочного цвета, пигмент отсутствует, профиль плоский, поверхность гладкая, край лопастной. Мелкие палочки, аспорогенные, грамотрицательные, каталазоотрицательные.

Штамм №5: колония округлой формы, бежевого цвета, пигмент отсутствует, плоский профиль, поверхность – круговая исчерченность, гладкая; край неровный. Палочки, собраны в цепочки, споры есть, грамположительные, каталазоположительные.

Штамм №9: колония округлой формы, бежевого цвета, пигмент отсутствует, профиль выпуклый, гладкая поверхность, край ровный. Кокки/палочки в цепочках по 3-5, грамположительные, аспорогенные, каталазоположительные.

Исследование соотношения доминирующих микроорганизмов в ризосферной почве показало, что во всех образцах, независимо от формы внесения МЕТ, доминировали одни и те же бактерии (рис.).

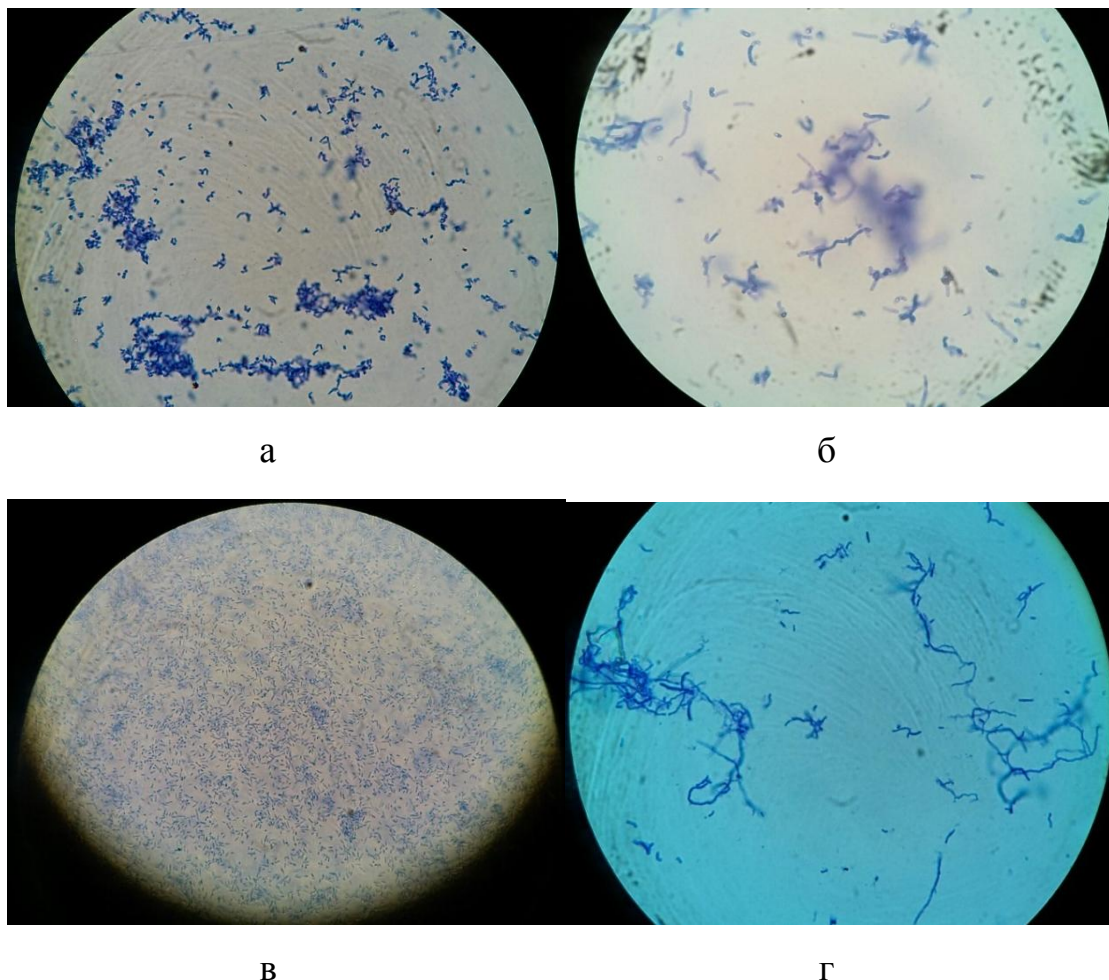


Рисунок — Доминирующие почвенные бактерии ризосферной микрофлоры тестовых растений.

Во всех вариантах, кроме негативного контроля, было обнаружено наличие бактерий рода *Bacillus*. Это может быть связано с тем, что бактерии рода *Bacillus* относятся к ПГА-деструкторам, а также способны использовать сложные органические вещества, в том числе пестициды, в качестве субстрата. Возможно, постепенная деградация полимерной основы ПЗГБ и выход препарата, способствовали увеличению их численности в почве по сравнению с негативным контролем.

Таким образом, таксономический состав доминирующих бактерий ризосферной микрофлоры пшеницы при внесении метрибузина не имел существенных отличий от ризосферы контрольного образца.

3.3 Гербицидное действие различных форм метрибузина в посевах пшеницы, зараженных сорными растениями

Гербицидную активность метрибузина оценивали путем сравнения сухой биомассы пшеницы (г/м^2) и сухой биомассы донника (г/м^2) на 10-е, 20-е и 50-е сутки после посева. Все разработанные формы МЕТ, депонированного в разрушаемую основу из поли-3-гидроксипропирата, обладали выраженной гербицидной активностью.

[Изъято 2 страницы]

Таким образом, применение гербицида метрибузина для борьбы с модельным сорным растением – донником обыкновенным (*Melilotus albus*) показало эффективность действия экспериментальных форм в виде пленок и микрогранул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам работы были сделаны следующие выводы:

1. Влияние гербицида метрибузина на общую численность ризосферных бактерий при выращивании пшеницы и донника зависело от препаративной формы гербицида. Внесение в почву коммерческого препарата Зенкор Ультра привело к снижению общей численности бактерий в почве в 1,75 раз по сравнению с негативным контролем. Аналогичное действие оказал препарат метрибузин, депонированный в биоразрушаемую основу из поли(3-гидроксibuтирата), в виде пленок. Депонированный метрибузин в форме микрогранул не оказал достоверного влияния на развитие ризосферных бактерий.
2. Независимо от способа доставки метрибузин достоверно не изменял численность актиномицетов и грибов в ризосфере пшеницы по сравнению с негативным контролем.
3. Исследование таксономического разнообразия показало, что внесение метрибузина в почву стимулировало развитие спорообразующих бактерий рода *Bacillus*.
4. Экспериментальные формы метрибузина, депонированного в полимерную основу из поли(3-гидроксibuтирата), не уступали по эффективности гербицидного действия коммерческому препарату.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Байрамбеков, Ш. Б. Метрибузин-универсальный гербицид для защиты томата / Ш. Б. Байрамбеков, З. Б. Валеева, О. Г. Корнева // Защита и карантин растений. – 2011, №. 4.
- 2 Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. // Издательство «Красноярский писатель. – 2011.
- 3 Волова, Т. Г. Фундаментальные основы конструирования и применения сельскохозяйственных препаратов нового поколения / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, С. В. Прудникова, А. Н. Бояндин, Е. И. Шишацкая. // Красноярск: Красноярский писатель. – 2016. – С. 80–85.
- 4 Захаренко, В. А. Пестициды в аграрном секторе России конца XX – начала XXI века / В. А. Захаренко. // Агрохимия. – 2008, № 11. – С. 86–96.
- 5 Козловский, А. Г. Изучение биodeградации поли-β-гидроксibuтирата микроскопическими грибами / А. Г. Козловский, В. П. Желифонова, Н. Г. Винокурова // Микробиология. Т. 68, № 3. – 1999. – С. 340-346.
- 6 Круглов, Ю. В. Микрофлора почвы и пестициды / Ю. В. Круглов. – Москва : Агропромиздат. – 1991. – 129 с.
- 7 Куликова, Н. А. Гербициды и экологические аспекты их применения: учебное пособие. / Н. А. Куликова, Г. Ф. Лебедев. – Москва : Либриком, 2010. – 153 с.
- 8 Мельников, Н. Н. Перспективы производства и применения пестицидов/ Н. Н. Мельников //Химия в сельском хозяйстве. – 1979, №. 6. – С. 13-19.
- 9 Мельников, Н. Н. Пестициды. Химия, технология и применение / Н. Н. Мельников //М.: Химия. – 1987. – Т. 710. – С. 712.
- 10 Нетрусов, М. А. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук / под ред. А. И. Нетрусова. - М.: ИЦ «Академия», 2005. - 612 с.

11 Прудникова, С. В. Микробиологическая деградация полигидроксиалканоатов в модельных почвенных средах / С. В. Прудникова. // Вестник КрасГАУ. – 2012, №10. – С. 39-43.

12 Прудникова, С. В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами : монография / С. В. Прудникова, Т. Г. Волова. – Красноярск : Красноярский писатель, 2012. – 184 с.

13 Россихина, О. Н. Видовое разнообразие почвенных микромицетов-деструкторов полигидроксиалканоатов //Сб. IX Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука». - 25 апреля 2013, Красноярск.

14 Сельскохозяйственный онлайн справочник Пестициды.ру [сайт]. - Режим доступа: <http://www.pesticidy.ru/>.

15 Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи /Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямс – М.: «Мир», – 1997. – Т. 1, Т. 2.

16 Шутко, А. П. Рынок средств защиты растений в мире и России:тенденции, динамика, прогнозы / А. П. Шутко, А. Г. Долгова // Международный студенческий научный вестник. – 2015, № 2. – 14 с.

17 Bonartsev, A. P. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers-natural polyesters produced by diazotrophic bacteria / A. P. Bonartsev, V. L. Myshkina, D. A. Nikolaeva, E. K. Furina¹, T. A. Makhina, V. A. Livshits, A. P. Boskhomdzhiyev, E. A. Ivanov, A. L. Iordanskii, G. A. Bonartseva. // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. – 2007. – Т. 1. – С. 295-307.

18 Campos, E.V.R. Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals / E. V. R. Campos, J. L. de Oliveira, L. F. Fraceto, B. Singh. //Agronomy for Sustainable Development. – 2015. – Т. 35, №. 1. – С. 47-66.

19 Céspedes F. F. Bentonite and anthracite in alginate-based controlled release formulations to reduce leaching of chloridazon and metribuzin in a calcareous soil /

F. F. Céspedes, S. Pérez García, M. Villafranca Sánchez, M. Fernández Pérez. //Chemosphere. – 2013. – T. 92, №. 8. – C. 918-924.

20 Ceyhan, N. Poly--hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain / N. Ceyhan, G. Ozdemir. //African Journal of Microbiology Research. – 2011. – T. 5, №. 6. – C. 690-702.

21 Damalas, C. A. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators / C. A. Damalas, I. G. Eleftherohorinos // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2011. – T. 8, №. 5. – C. 1402-1419.

22 Dash, S. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2010. – T. 67. – №. 3. – C. 217-23.

23 Doi, Y. Cyclic nature of poly (3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus* / Y. Doi, A. Segawa , Y. Kawaguchi, M. Kunioka //FEMS Microbiology Letters. – 1990. – T. 67. – №. 1-2. – C. 165-169.

24 Fedtke, C. Nitrogen metabolism in photosynthetically inhibited plants / C. Fedtke. // Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur – Springer Berlin Heidelberg, 1981. – C. 260-265.

25 Fernández-Pérez, M. Prevention of chloridazon and metribuzin pollution using lignin-based formulations / M. Fernández-Pérez, M. Villafranca-Sánchez, F. Flores-Céspedes, S. Pérez-García, I. Daza-Fernández //Environmental Pollution. – 2010. – T. 158, №. 5. – C. 1412–1419.

26 Fernandez-Urrusuno, R. Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose / R. Fernandez-Urrusuno, J. M. Gines, E. Morillo // Journal of Microencapsulation. – 2000, – T. 17, № 3. – C. 331– 342.

27 Ghormade, V. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants / M. V. Deshpande, K. M. Paknikar // Biotechnology Advances. – 2011. – T. 29. – №. 6. – C. 792– 803.

28 Grillo, R. Poly(-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides. Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation / R. Grillo, N. Zocal Pereira, C. R. Maruyama, A. H. Rosa, R. de Lima, L. F. Fraceto // Journal of Hazardous Materials. – 2012, – Vol. 231. – P. 1–9

29 Kiselev, E. G. The Kinetics of Fungicide and Herbicide Release from Slow-Release Formulations Prepared from Degradable Poly-3-Hydroxybutyrate / E. G. Kiselev, S. V. Baranovskiy // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. – Krasnoyarsk, 2016. – T. 9, № 2. – C. 233.

30 Maqueda, C. Novel System for Reducing Leaching of the Herbicide Metribuzin Using Clay– Gel-Based Formulations / C. Maqueda, J. Villaverde, F. Sopena, T. Undabeytia, E. Morillo. //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – T. 56. – №. 24. – C. 11941-11946.

31 Mogul, M. G. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management / M. G. Mogul, H. Akin, N. Hasirci, D. J. Trantolo, J. D. Gresser, Donald L. Wise. // Resources, Conservation and Recycling. – 1996. – T. 16, №. 1. – C. 289-320.

32 Perez-de-Luque, A. Nanotechnology for parasitic plant control / A. Perez-de-Luque, D. Rubiales. // Pest Management Science. – 2009. – T. 65, №. 5. – C. 540-545.

33 Roy, A. Controlled pesticide release from biodegradable polymers / A. Roy, S. K. Singh, J. Bajpai, A. K. Bajpai. //Central European Journal of Chemistry. – 2014. – T. 12, №. 4. – C. 453-469.

34 Sanyal, P. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by some soil *Aspergillus* spp. / P. Sanyal, P. Samaddar, A. Paul. // Journal of Polymer and the Environment – 2006. – Vol. 14. – P. 257-263.

35 Savenkova, L. PHB-based films as matrices for pesticides // L. Savenkova, Z. Gercberga, O. Muter, V. Nikolaeva, A. Dzene, V. Tupureina // Process Biochemistry. – 2002. – Vol. 37. – P. 719–722.

36 Shaviv, A. Advances in controlled-release fertilizers / A. Shaviv. //Advances in Agronomy. – 2001. – T. 71. – C. 1-49.

37 Sopena, V. F. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. / V. F. Sopena, C. P. Maqueda, G. E. Morillo. //Ciencia e Investigación Agraria. – 2009. – T. 36. – №. 1. – C. 27-42.

38 Sopeña, F. Controlled release of the herbicide norflurason into water from ethylcellulose formulations. / F. Sopeña, A. Cabrera, C. Maqueda, E. Morillo. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53. – P. 3540-3547.

39 Trenkel, M. E. Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture / – Paris : International Fertilizer Industry Association, 1997. – T. 11.

40 Volova, T. G. Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications / T. G. Volova. - Nova publishers, 2004.

41 Wilson, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs / C. Wilson, C. Tisdell. // Ecological Economics. – 2001. – T. 39, №. 3. – C. 449-462.

42 Zhang, B. Microorganism-based monodisperse microcapsules: encapsulation of the fungicide tebuconazole and its controlled release properties / B. Zhang, T. Zhang, Q. Wangb, T. Ren. // RSC Advances. – 2015. – T. 5, №. 32. – C. 25164-25170.

43 Zinn, M. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate / M. Zinn, B. Witholt, T. Egli //Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – T. 53, №. 1. – C. 5-21.